

(11)Publication number : 57-005693

(43)Date of publication of application : 12.01.1982

(51)Int.Cl. C12P 13/10
// C12N 15/00
C12P 19/34
(C12P 13/10
C12R 1/185)

(21)Application number : 55-079959

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 13.06.1980

(72)Inventor : MOMOSE HARUO
ISHIDA MASAOKI
TERABE MASATO

(54) PRODUCTION OF L-ARGININE THROUGH FERMENTATION PROCESS

(57)Abstract:

PURPOSE: The vector in which the arg A gene controlling N-acetylglutamic acid synthetase is built is included in a DNA acceptor in Escherichia and the microorganism is cultured, then the titled substance is collected from the culture mixture.

CONSTITUTION: The arg A gene that controls N-acetylglutamic acid synthetase is extracted from a microorganism in Escherichia. The gene is built in the vector- DNA that is obtained from the plasmid of Escherichia, then included in the DNA acceptor in Escherichia. The resultant L-arginine-producing microorganism is cultured in a usual medium containing carbon source, nitrogen source, inorganic ions and aminoacids aerobically until the accumulation of L-arginine stops. L-arginine is collected from the culture mixture by a usual method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A)

57—5693

60 Int. Cl.²

識別記号

厅内整型符号

公開 昭和57年(1982)1月12日

C 12 P 1370

6712-4 B

衆明の教 1

✓ C 12 N 15/00

7235-4 B

審查請求 未請求

C 12 P 19/34

6712-4 B

(C 12 P 13/10

(全 4 頁)

C 12 R U/185)

④発酵法によるL-アルギニンの製造法

川崎市川崎区観音2丁目20-8

昭55-79959

公 榮 明 者 寺 部 真 人

出 願 昭55(1980)6月13日

横浜市緑区美しが丘1丁目14番

● 明 者 百 瀬 春 生

出 題 人 味の素株式会社

鎌倉市玉環 2 丁目 24-2

東京都中央区京橋1丁目5番8

⑫発 明 者 石田雅昭

号

● ● ●

1. 電解の名称 見解法によるシーアルギョンの製造法

2. 何首烏水の製造

エシエリヒア属の微生物より得たN-アセチルグルタミン酸を分解する能力を持つ微生物を組み込んだベクターを含有し、*Sh. rubra* 増殖能を有するエシエリヒア属の微生物を構築し、汚染地に移植された*Sh. rubra* の増殖能力を評価することを特徴とする発酵法による*Sh. rubra* の新増殖。

1. 見聞の経緯を説明

この発明は発露法によるシ－アルゲニンの製法に關する。

異様に多い。シアロガリンの製造法に關し、アレロパタリウム菌、コナネパタリウム菌、エンセラシア属等の菌類がシアロガリンを生産することが知られている。

なれに対し不透明者は、メンエリセア風の

酸塩基より得た N-アセチルグルタミン酸誘導体
系を支配する arg 遺伝子 (Microbiological
Reviews, Vol. 40, 116-127, March, 1975)

を認め込んだベクター¹²⁾を含有するエンテロコッカスの微生物が、上記ベクターを含有しない通常のエンテロコッカス属のシェーデルマン生産物を有する菌株群より高い収率でシェーデルミンを生産することを知つた。

本実験のアルギニン生産能を有する微生物を調
らねば、少くとも *argA* 遺伝子を有する *Escheri-*
chia coli の微生物を DNA 供体とし、これより過
剰の染色体 DNA 抽出液より染色体 DNA を抽
出する。

DNA 修飾剤としては、N-アセチルグルタミン酸合成酵素阻害性のより高いものとして、L-アルギニン自身による遺伝阻害のないものが好ましい。このような面では多くの場合、L-アルギニン生合成能が高く、ローメチルメチオラン、p-フルオロフェニルアラニン、D-アルギニン、アルギニンヒドロクサミド、S-(2-アミノエチル)-N-

メチリン、モノメチルメチリン、β-メチルアミノ
アラニン、α-アミノアラニン等の塩基に耐性を
有する変異株として得ることが出来る。

抽出された染色体DNAは、制限エンドヌクレ
アーゼにより、適宜切断される。制限エンドヌ
クレアーゼは、反応時間を調整すれば、多くのもの
が使用できる。

ベクター-DNAとしては、エンテロコッカス
ラウリス種タイプのプラスミドより得られたものな
らなくても用いることができる。

このベクターに上述の染色体DNAフラグメン
トを組み込む方法は、特許の方法を要しない。

かくして得られたハイブリッドプラスミドを、
エンテロコッカスのDNA感受性に変異させる方
法も又、従来知られているすべての形質転換方法
が、希求の性質はあつてもいずとも適用できる。

上述ハイブリッドプラスミドの感受性としては、
エンテロコッカスのレーアルギニン要求株 (argA
変異株) が、目的とする形質転換を選択・分離
するのに特許合致して適用用いられるが、レーア

ルギニンを要求せず、特に更に特定の基座のレ
ジューに耐性を有し、かつアミノ酸合成経路
以下を失活せしめたarg⁺変異株を感受性とし
て用いれば、よりレーアルギニン生産性の高い菌
株が得られる。この場合の形質転換後の選択・分
離も、特許の方法を要せず、ベクター-DNAが
有する性質及び必要により感受性がある性質
を形質転換して選択・分離すればよい。

又レーアルギニン生産性の高い変異株を得る
ために、argA、C、D、E、F、G、H、I座
位上 (Genetological Reviews, Vol. 40, 116
-167, Maeh, 1974) を行動的にベクターに
組み込ませたハイブリッドプラスミドを用いて形
質転換するのが好ましい。又感受性又は形質転換
性を人工変異処理して、レーアルギニンの分解能
性を低下せしめるような変異を起せしめるのも効
果的である。

かくして得られたレーアルギニン生産性を増進
する方法は、従来のレーアルギニン生産菌の増殖
方法と特に異なる。即ち、用途としては、皮革

類、皮革類、繊維イオン、更に必要に応じてアミノ
酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する培養
のものである。原料としては、グルコース、シ
ュクロース、ラクトース等及びこれらを含有す
る酵母加水分解液、糊質、カセイ等が用いられる。
培養液としては、アンモニウム塩、アンモニウム水、
アンモニウム塩その他が用いられる。また、塩化
カルシウム、クエン酸、酢酸、グルコン酸、酒石
酸、リン酸等の有機酸を添加すれば、より好ま
しい結果が得られる場合が多い。

培養は好気的条件下で温度のpH及び湿度を通
常調整しつつ、実質的にレーアルギニンの生産能
力が停止するまで行われる。

かくして培養液中には高濃度のレーアルギニンが
生成蓄積される。培養液よりレーアルギニンを提
取するには通常の方法が適用できる。

本発明の最良態を用いることにより、従来知ら
れているエンテロコッカス・コラーのレーアルギニン
生産菌を用いる場合と比べ、レーアルギニンの生
成率が大幅に向上し、更にレーアルギニン

以外のアミノ酸の濃度が低く、レーアルギニンの
分離・精製の煩雑性が軽減される。

実施例1

(1) argA遺伝子を担う染色体DNAの抽出

AJ 1534株 (エンテロコッカス・コラー
12株 (ATCC 14798) より変異誘導した
レーアルギニンヒドロキシメチル化株で、¹⁵N
変異が導入されている) を1日の培養 (ペプト
ン1%, 酵母エキス0.5%, グルコース0.1%,
MgCl₂ 0.5%, pH 7.2に調整) 後30°Cで約3
時間振盪培養を行い、対数増殖期の菌体を集菌後、
フェノール法による通常のDNA抽出法によつて
染色体DNAを抽出精製し、最終1.5mlを得た。

(2) ベクター-DNAの調製

ベクターとしてアンピシリン耐性、テトラサイ
クリン耐性をマーカーとしてもつプラスミドの
pBR322のDNAを次のようにして調製した。
まず、pBR322をプラスミドとして保存するエ
ンテロコッカス・コラーAJ 12株の菌を1日の培

ムコース・サザノ酢・無菌培養地（グルコース
2g、 NH_4Cl 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 KH_2PO_4
3g、 NaCl 5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015g、サザノ酢2.0g）を
100mlの水に溶解し、pH 7.2に調整したものを基
本培地として用い、これにオートクレーブ
0.05g、アミノ酸0.05g、サザノ酢0.05g
1.0gを加え、使用量の栄養要素物質、生育促進
物質を添加して調整し、37℃で24時間培養後
2で培養したのち170 rpmのシェーカーで振
動を加え、更に培養した。1.6時間後培養
し、9.3g・mLの3D8培養液によって培養させ、
3.000×10⁶個の細胞を100mlの培養液に
これよりプラスミドDNAを感染後、メンブ
ロライドエタジラムブロマイド平面電泳装置
心液によって最終10.0μgのpBR322プラス
ミドDNAを分離した。

(ii) 染色体DNA断片のベクターへの挿入

(iii) 得た染色体DNA 30μgをとり、制限エ
ンзимステアラーゼBpaRI、HindIII、BamHI、

SaI Iをそれぞれ用い、37℃で15分、30分、
45分、1.20分反応させ、DNA断片をベ
クターに切断した。中で得たベクター-DNAの割合は
1.20分反応させ、完全に切断せしめた。45分
6分の反応後、各断片を制限酵素とベクター
切断反応液を混合し、ATP及びジチオサリ
トール存在下、T4アダーゼ由来のDNAリガーゼ
によって10℃、24時間DNA断片の連結反応を行
った。45分、30分の反応後、各反応液に2倍
量のエタノールを加えて遠心分離して得たDNA
を乾燥させた。

(iii) *argA* 遺伝子を担ったプラスミドによる細胞
感染

培養細胞のための受容体として、*argA* 遺伝子
産物であるN-アセチルグルタミン酸合成酵素の
欠陥したアルギニン要求性菌株 (*argA*⁻)
の1株を用いた。*argA* 遺伝子は、染色体上
6.0分の位置にあり、リジン合成を支配する *lysA*
遺伝子 (6.1分) とは隣接しているため、
エンズリア・コリーター12倍からエタノール

アミンを添加して得たアルギニン要求性の中
から *argA*⁻ と *lysA*⁻ 遺伝子の同時発現体 (コ
トランスダクション) 産物を示す株を1-2週間
培養アミンを用いて選ぶことにより容易に目的
の *argA*⁻ 株を得ることができる。

さて、かくして得られた *argA*⁻ 株を13株を
培養100mlに接種し、37℃で24時間培養を行い、
24時間培養後培養液を100mlに接種し、これを
水浴中0.1M MgCl_2 、0.1M CaCl_2 、各50mlに
添加して培養することによっていわゆるコンビナ
ント (DNA取り込み型を有する) 細胞を調製した。
このコンビナント細胞を調製後、(ii) で得たD
NA (アルギニン産生性 *argA*⁺ 要求性遺伝子を
担ったプラスミドDNAが含まれる) の溶液を
加えて氷冷下30分反応させ、遠心分離後、2
分のエタノールを加え、再び氷冷下30
分放置してDNAを細胞内に取り込ませた。つぎ
に、この細胞懸濁液の一定量を所定なし培地に播
種し、37℃、24時間培養後培養液を100mlに接種し、
24時間培養後、再度培養を100mlに接種し、

定常培養培地プレート (グルコース2g、

(NH_4Cl 50、1g、 KH_2PO_4 7g、 KH_2PO_4
3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、サザノ酢2.0g) を
100mlの水に溶解し、pH 7.2に調整
したものを基本培地とし、これに水2.5gを
加えて調整した液体培地) に接種し、37℃、3
日間培養した。生じたコロニー (アルギニン生
産性) を観察し、再び最少培地上で純化後、ア
ンビシリン20 μg/板含有なし培地プレート上で
pBR322に由来するアンビシリン耐性マーカー
の遺伝子を感染した (用いた制限酵素はいずれも
10μl マーカーを供給する。アンビシリン無
培地プレート上で生育しなければならぬ)。かく
して得られたアルギニン要求性かつアンビ
シリン耐性の株17株につき、試験培養後よりア
ルギニン産生性を検定したところ、いずれもア
ルギニン産生性を示した。このことは、染色体DNA
上の *argA* 遺伝子領域が、pBR322 プラスミド
のDNAに挿入されて生じた融合プラスミドDNA
を取り込んだ細胞のみがコローとして増殖され、

しかもそれらがアムステルダム協定を有してい
たことを主張する。

(四) 所屬アハザニノ中區圖繪尺ヨリL-Aハザニ
ノ位置

10で得られた例題のうちA, J (1992)
(FERM-P 2616) 数を用いてレーアルゲムン
を発生させた試験結果を表1表Aに示した。見
部は500mlアラスタ中にアルゲムン充填層地
(グルコース 5 g/dl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g/dl,
 KH_2PO_4 0.2 g/dl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/dl,
酢酸エタール 0.05 g/dl, タイアリン酸塩
1.000 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dl,
 $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dl, 炭酸カルシウム 2.5
g/dl (別設備), KOH 比より pH 7.0に調整)
を20ml投入し、これに密栓をし金耳取えつ、
30℃, 3日間恒温培養して行つた。培養後の透
心上清中のレーアルゲムンは、バイオアッセイ
で測定した。

降で足部を行い、その結果を第1表Cに示した。
 おて明かりをように、新成アルゲニン生産性
 AJ 11534は、原成AJ 11534降に對し
 て顯著な生産性の増加を示している。

を、かくして得られた銅塩アルギニン塩酸塩 A-1 (1.594 倍より再び新成アラスコドを生成例 1 の法で述べたのと同様の方法によつて分離取除し、アガロース電気泳動法により既知の型様のアラスコドと比較して分子量を測定したところ、3.7 ノガルトンと算出された。したがつて 3BR322 (2.6 ノガルトン) からの増分 1.1 ノガルトンの DNA 部分化、アルギニン塩酸塩性を支配する 388A 塩基塩基子が存在していると考えられる。

第1段 シーアルゲムン坐量試験

	種 別	レーザヤニ生産量 (kg/株)
A	AJ 11592	6
B	AJ 11594	190
C	AJ 11531	73

特許出願人 株式会社日立製作所

实例 2

實驗例1)で得られたアルギニン生産菌AJ 11533株をもつ新媒プラズミドを、実験例1)の如く述べたのと同様の方便によつて分離増殖し、これを10で述べたのとほぼ同様の方法によつて今度は原液のAJ 11534株(アルギニン培養液中で、アルギニン合成阻害遺伝子に失活変異(arg^R+)をもち、且つシーアルギニンビロケタム酸経路のアルギニン生合成)へ形質転換に成功して導入した。この際、新媒プラスミドの導入された形質転換株の選択にフェニルチオ尿素抗性マーカー(arg^R+)は利用できないので、p88222ゲノム組のマーカ―であるアンピシリン耐性を利用し、アンピシリンを0.05/μl含有の琼脂プレート上で目的とする形質転換株を選択分離した。得られた産菌AJ 11534(ABE-M-P 567)を用い、実験例1)の如く述べたのと同様の方便でシーアルギニンの発酵生産試験を行った結果を表1表2に示した。対照として、新媒アルギニン生産の菌株であるAJ 11534株を用い、同様の条